

## ⑫ 公開特許公報(A)

平2-195830

⑤Int.Cl.<sup>5</sup>A 01 H 4/00  
A 01 N 63/02

識別記号

B

庁内整理番号

8502-2B  
7057-4H  
8515-4B

④公開 平成2年(1990)8月2日

C 12 N 5/00

F※

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑭発明の名称 人工種子発芽促進剤

⑰特 願 平1-15841

⑱出 願 平1(1989)1月25日

⑲発 明 者 和 気 仁 志 埼玉県草加市吉町4-1-8 ベンテる株式会社草加工場内

⑲発 明 者 小 野 真 由 美 埼玉県草加市吉町4-1-8 ベンテる株式会社草加工場内

⑲発 明 者 菱 沼 清 埼玉県草加市吉町4-1-8 ベンテる株式会社草加工場内

⑲発 明 者 梅 津 博 紀 埼玉県草加市吉町4-1-8 ベンテる株式会社草加工場内

⑳出 願 人 ベンテる株式会社 東京都中央区日本橋小網町7番2号

㉑出 願 人 松 永 是 東京都府中市幸町2-41-13 府中第三住宅2-304

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

人工種子発芽促進剤

## 2. 特許請求の範囲

植物体再生組織を人工的に作成した膜で包埋したものを人工種子として用いる際、人工種子発芽促進剤として微細藻類培養濾液及び／又は微細藻類抽出物を用いることを特徴とする人工種子発芽促進剤。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、人工種子発芽促進剤に関する。

(従来の技術)

植物組織培養とは、植物細胞の分化全能性による細胞の脱分化(カルス化)、再分化に基づくものである。

近年の植物バイオテクノロジーの進歩にともない、植物組織培養技術を用いて植物体再生組織(将来植物体へと発達しうる培養体や組織片、器官

等)を培養し、植物体再分化を行わせることは、数多くの植物種に於いて可能であることが示されている。また、植物組織培養を利用したクローン植物大量増殖法の一つとして、人工種子の開発が着目され、野菜やイネなど多くの植物種で実用化に向けての試みがなされている。

人工種子は、植物体の1部から植物組織培養技術によって作成した不定芽、不定胚(体細胞胚)等の植物体再生組織をアルギン酸カルシウムのような吸水性ゲルや各種の高分子膜で包んだものである。人工種子に用いる不定芽、不定胚を得るには外植体から直接発生させる方法と培養細胞(カルス)を経由して発生させる二つの方法があるが、人工種子の開発には大量の均一な不定胚を得る必要があるため、培養細胞経由の方が有利であると言われている。

人工種子中に包埋される植物体再生組織については、遺伝的変異の問題において、不定胚を経て植物体再分化を行った方が、不定芽を経て植物体再分化をさせるよりも遺伝的変異が少ないと考え

られているため不定胚を包埋することが有利であると言われている。

また、不定胚は受精胚と形態的に類似しているため受精胚のように乾燥に耐え、長期間貯蔵が可能であるという性質を有することが期待されている。さらに不定芽と比較して不定胚は、起源となる細胞が少なく培養細胞から誘導できる植物種に於いては1つの細胞塊から1つの胚を経て、1つの固体が形成できるため、クローニングの方法としてはきはめて効率がよく大量増殖を行う上で有効である。従って人工種子の開発においては不定胚を包埋するのが主流となっている。

人工種子は、植物体再生組織を人工的な胚乳と人工膜によって包埋しているが、これらの組成、素材、製法などについても種々検討されている。人工的な胚乳は、人工種子に於て植物体再生組織に栄養を与えたり発芽を制御する物質を含む部分である。現在、植物ホルモンの一種であるアブシジン酸の添加が人工種子の発芽率を高めるとの報告などもあるが、アブシジン酸の場合は、播種後、

水に溶解拡散して除去されるのであるが、そのために時間を要し発芽が良好でない場合がある。一般的には不定胚の生長を促進し、人工種子の発芽率を高めたというような特殊な効果を示す植物調節物質の存在は知られていない。また、高濃度の糖等を添加する方法なども提案されているが、雑菌の繁殖を促し、生育に支障をきたす場合がある。人工膜については、現在人工イクラに用いられているアルギン酸カルシウムが最適とされているが、その他の高分子ゲル化剤についても種々検討されている。

(発明が解決しようとする課題)

現在知られている植物組織培養技術を用いて得られた植物体再生組織を人工種子として用いた場合、発芽率が低く乾燥に弱いなどの問題点がある。特に、植物ホルモン処理して育成した不定胚を用いた場合、理由は定かではないが、発芽率が低いことが報告されている。前記したとおり、不定胚は通常培養細胞から誘導される。しかしながら、培養細胞の培養には植物ホルモンの添加は不可欠

である。培養細胞は組織培養技術によって大量、迅速に培養することが可能で、その産業的利用価値は高い。そこで、最近植物ホルモンを用いて培養された培養細胞から発生した不定胚であってもアブシジン酸を添加することで優良な不定胚へと生長させる方法や、植物ホルモンを用いず外植片から直接高濃度の糖を添加することで得られた不定胚を人工種子中に包埋して用いる方法などが提案されているが、それぞれにまた新たな問題を生じているのが現状である。このように近年植物バイオテクノロジーの進歩とともに研究が盛んに行われている優良クローン植物大量増殖法の1つとしての人工種子開発は、植物体再生組織の生理学的な部分、植物組織培養技術のテクノロジーとしての部分に未だ不明な点が多く解決できない幾多の問題点がある。

(課題を解決するための手段)

本発明は、上述せる問題点に鑑みなされたもので、植物体再生組織を人工的に作成した膜で包埋したものを人工種子として用いる際、人工種子発

芽促進剤として微細藻類培養濾液及び／又は微細藻類抽出物を用いることを特徴とする人工種子発芽促進剤を要旨とするものである。

本発明で利用できる微細藻類としては、紅藻類、緑藻類、黄緑藻類、珪藻類、黄色鞭毛藻類、渦鞭毛藻類などがある。緑藻類としては、ブラキオモナス (*Brachionomonas*) 属、クラミドモナス (*Chlamydomonas*) 属、クロレラ (*Chlorella*) 属、ロボモナス (*Lobomonas*) 属、ネフェロクラミス (*Nephrochlamys*) 属、ネフェロデエラ (*Nephrodiella*) 属、プロトシフォン (*Protosiphon*) 属、プロトテカ (*Prototheca*) 属、セネデスムス (*Scenedesmus*) 属、セレナストゥルム (*Selenastrum*) 属などがあり、具体例としては、ブラキオモナス・スブマリナ (*Brachionomonas submarina*) A T C C 30597、クラミドモナス・ドルソベントラリス (*Chlamydomonas dorsoventralis*) A T C C 30594、クラミドモナス・オウガメトス (*Chlamydomonas eugametos*) A T C C 30401、クラミドモナス・モノイカ (*Chlamydomonas monoica*) A T C C 3

0629、クラミドモナス・プソウダグロエ(*Chlamydomonas pseudagloe*) ATCC 12235、クロレラ・エリプソイデア(*Chlorella ellipsoidea*) ATCC 11466、クロレラ・ルテオヴィリディス(*Chlorella luteoviridis*) ATCC 30406、クロレラ・ミニアタ(*Chlorella miniata*) ATCC 30546、クロレラ・サッカロフィラ(*Chlorella saccharophila* var. *saccharophila*) ATCC 30408、クロレラ属(*Chlorella* sp.) ATCC 11469、クロレラ・バリエガタ(*Chlorella variegata*) ATCC 30409、クロレラ・ブルガリス(*Chlorella vulgaris*) ATCC 11468、クロレラ・キサセラ(*Chlorella xanthella*) ATCC 30411、ロボモナス・ピリフォーミス(*Lobomonas piriformis*) ATCC 30403、ネフエロクラミス・スブソリタリア(*Nephrochlamys subolitaria*) ATCC 30433、ネフエロデラ・ブレビス(*Nephrodiella brevis*) ATCC 30440、プロトシフォン・ボテリオイデス(*P*

*rotosiphon botryoides*) ATCC 30436、プロトテカ・スタッグノラ(*Prototheca stagnora*) ATCC 16528、セネデスムス・ビジュガトウス(*Scenedesmus bijugatus*) ATCC 11462、セネデスムス・クワドリカウド(*Scenedesmus quadricauda*) ATCC 30428などが挙げられる。黄緑藻類としては、ボティリデウム(*Botrydium*)属、ミシヨコッカス(*Mischococcus*)属、モノダス(*Monodus*)属、オフィオシテウム(*Ophiocytium*)属などがあり、具体例としては、ボティリデウム・ベケリアニウム(*Botrydium becherianum*) ATCC 30602、ボティリデウム・シストスム(*Botrydium cystosum*) ATCC 30589、ミシヨコッカス・スファエロセファラス(*Mischococcus sphaerocephalus*) ATCC 30592、モノダス・セプテラネウス(*Monodus subterraneus*) ATCC 30593、オフィオシテウム・マジユス(*Ophiocytium majus*) ATCC 30601などが挙げられる。黄色鞭毛藻類としては、オクロモナス(*Ochromonas*)属などがあ

り、具体例としては、オクロモナス・ダニカ(*Ochromonas danica*) ATCC 30004、オクロモナス・マルハメンシス(*Ochromonas malhamensis*) ATCC 11532などが挙げられる。また、微細藻類は、上記した微生物あるいはその変種や変異株に限ることなく、天然から分離した海洋性、淡水性の微細藻類も含まれる。

微細藻類の培養は、通常、無機塩類等を含む培地を用い、タンク培養あるいは太陽光を利用した屋外開放培養で行い得るが、本発明においては、目的とする微細藻類が天然にある程度豊富に存在するならば、その微生物の生育存在する海水あるいは淡水を培養液とすることができる。

微細藻類培養濾液は上述した培養法で得られる培養液を遠心分離あるいは濾過などを行って取得されるが、目的とする培養濾液の生物活性が弱い場合は、前記濾液を減圧濃縮などにより濃縮して用いてもかまわない。この際、濃縮倍率が大きくなり塩濃度が高くなると植物組織に悪影響を与えることがあるので、電気透析などで植物組織に悪

影響がなくなるまで脱塩して使用するのが望ましい。

また、微細藻類の抽出物は、前記のようにして得られた菌体または適度に破砕した菌体を常温または加熱した適当な溶媒と接触させて行い得たものであるが、ここで用いる溶媒としては、菌体によって種々の溶媒を単独または複数併用してかまわないが、一般的には水性溶媒が好ましい。例えば水性溶媒としては、水単独あるいは酸、塩基、塩類、もしくは有機溶媒を溶解した溶液などがある。また、メタノール、エタノール、酢酸エチルエステル、エーテル等の有機溶媒で抽出後、有機溶媒を除去後水に溶解させてもよい。このようにして得られた微細藻類培養濾液あるいは微細藻類抽出物を添加する形態としては、上述した溶液の形態で添加してもよいし、これらを適宜濃縮あるいは希釈して使用できる。さらに、これらの培養濾液あるいは抽出液または塩基性物質を含む分画液を減圧乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥等により乾燥し粉末としても使用できる。さらに活性の強い画

分を得るには透析、ゲル濾過、限外濾過等を行い、分子量の大きさで分画し各々の活性画分を用いてもよい。

微細藻類培養濾液及び／又は微細藻類抽出物の培地への添加量は、0.0001～50%で使用目的、使用方法によって適宜選択できるが、望ましくは0.001～10%である。

以上述べた、微細藻類培養濾液及び／又は微細藻類抽出物や微細藻類培養濾液を人工種子発芽促進剤として培地に添加し、その培地と植物体再生組織を人工種子としてアルギン酸カルシウム、寒天、ゼラチン、カラギーナン、ポリビニルアルコール、カルボキシメチルセルロース等の吸水性ゲルで包埋するが、培地としては、ムラシゲ (Murashige) & スクログ (Skoog) 培地が代表的なものとして挙げられるが、その他の植物組織培養に適した種々の培地、あるいはそれらの改変培地を適宜選択して使用できる。更に、通常の培養に使用される植物ホルモン、ココナツミルク、カゼイン分解物や酵母抽出物等を目的に応じて併せて

ス (*Scenedesmus bijugatus*) ATCC 11462、ボティリデウム・ベケリアニウム (*Botrydium becherianum*) ATCC 30602、オクロモナス・ダニカ (*Ochromonas danica*) ATCC 30004 を用いて調製した。

前記微細藻類を ATCC 指定の培養条件にて培養後、培養液を遠心濾過し濾液を得、エバポレーターで100倍に濃縮した。この濃縮液をモザイク荷電膜脱塩器 (デザルトン DS-103: 東ソー株式会社) で脱塩し、0.45  $\mu$ m のメンブランフィルターを用いて濾過し、得られた濾液を微細藻類培養濾液とした。微細藻類抽出物は菌体を集菌後凍結乾燥し、水に対して3%になるように菌体を懸濁させ、100℃で60分間熱水抽出し、遠心分離して上澄液を0.45  $\mu$ m メンブランフィルターにて濾過して得た。

## (2) ニンジン培養細胞からの不定胚の作製

ニンジンの無菌種子の芽生えにおいて胚軸が10cm位に生長したものを約1cm位に切断し、下記培地中で25℃、暗条件下で培養した。培地は、

添加してもよい。

本発明において培養の対象となる植物としては、特に制限はなく、全ての植物に適用可能である。また、植物は分化全能性を有していることが知られているので植物体再生組織 (将来植物体へと発達しうる培養物)、外植体 (植物体又はそれらの一部) または、外植体の初代培養体あるいは継代培養体も包埋され人工種子として使用可能である。特に、外植体としては不定胚、不定芽、実生等が好ましい。

## (実施例)

以下、実施例によってさらに詳しく説明するが、これにより限定されるものではない。

(1) 微細藻類培養濾液、微細藻類抽出物、及び微細藻類抽出物中からの高分子画分及び低分子画分の調整

クラミドモナス・ドルソベントラリス (*Chlamydomonas dorsoventralis*) ATCC 30594、クロレラ・ブルガリス (*Chlorella vulgaris*) ATCC 11468、セネデスムス・ビジュガトゥ

基本培地としてMS培地を使用し、これに植物ホルモンのオーキシニン類である2,4-Dを1mg/lの濃度で添加しpH5.5～5.7に調整したものである。得られたカルスを液体培養にて継代培養し、不定胚の形成に用いた。

不定胚は植物ホルモンである2,4-Dを含まない前記基本培地を用いて14日間、25℃、暗条件下で液体振盪培養することで誘導された。以下の実験では、148  $\mu$ m のナイロンメッシュを用いて148  $\mu$ m 以上に生長した不定胚のみを選別し使用した。得られた不定胚のほとんどは、球状から初期の心臓型胚であった。

## (3) 人工種子の調製及び人工種子発芽促進剤の効果確認

ニンジン培養細胞から誘導された不定胚を用いた人工種子に対する微細藻類培養濾液及び微細藻類抽出物発芽促進効果の検討を行った。

MS培地25ml中に(2)で得られた不定胚を懸濁し、包埋剤として3% (w/v) アルギン酸ナトリウムを含む75mlのMS培地と混ぜ合わ

せ、得られた混液 100 ml を得た。この時、

(1) で調整した各種人工種子発芽促進剤を各々最終混液 100 ml に対して 10% (W/V) の濃度で添加した。その後、最終混液を 50 mM 塩化カルシウム溶液中に滴下し、得られた球状体を人工種子とした。

次いで人工種子の培養は、無菌的に 25℃ 明条件下 (2000 ルックス、12 時間照明で 1 ケ月間培養した結果を表に示す。

(以下余白)

表

| 添加物              | 人工種子数<br>(個) | 発根数<br>(個) | 発芽数<br>(個) |
|------------------|--------------|------------|------------|
| 無添加              | 100          | 22         | 19         |
| クラミドモナス・ドルソベントリス |              |            |            |
| ・培養濾液            | 115          | 45         | 43         |
| ・抽出物             | 120          | 41         | 39         |
| クロレラ・ブルガリス       |              |            |            |
| ・培養濾液            | 121          | 47         | 43         |
| ・抽出物             | 115          | 48         | 41         |
| セネデスムス・ビジュガトウス   |              |            |            |
| ・培養濾液            | 123          | 44         | 43         |
| ・抽出物             | 143          | 40         | 39         |
| ボティリデウム・ベケリアニウム  |              |            |            |
| ・培養濾液            | 131          | 39         | 37         |
| ・抽出物             | 122          | 35         | 36         |
| オクロモナス・デニカ       |              |            |            |
| ・培養濾液            | 118          | 37         | 38         |
| ・抽出物             | 107          | 32         | 33         |

(発明の効果)

植物体再生組織 (将来植物体) を人工的に作成した膜で包埋した人工種子を産業的に利用する際人工種子発芽促進剤として微細藻類培養濾液及び/又は微細藻類抽出物を用いることで人工種子からの発芽を効率よく行わせることができる。

従って、組織培養による優良株の大量繁殖を効率よく行うことができ、真に実用的な技術とすることができる。あわせて、農業生産に大きな変革をもたらすことができる。

特許出願人 ペンてる株式会社

松永 是

第1頁の続き

⑤Int.Cl.<sup>5</sup>

C 12 N 5/04

識別記号

庁内整理番号

⑦発明者 松 永

是 東京都府中市幸町2-41-13 府中第三住宅2-304